

Rec'd PCT/PTO 17 JUN 2005

PCT/JPC3/16549

10/539534

日 本 国 特 許 庁

24.12.03

JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日  
Date of Application: 2003年 3月20日

出 願 番 号  
Application Number: 特願2003-076877  
[ST. 10/C]: [JP2003-076877]

出 願 人  
Applicant(s): エーザイ株式会社

REC'D 19 FEB 2004

WIPO

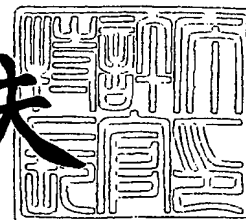
PCT

PRIORITY DOCUMENT  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)

2004年 2月 6日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

今 井 康 夫



【書類名】 特許願

【整理番号】 E1-A0205

【提出日】 平成15年 3月20日

【あて先】 特許庁長官殿

【発明者】

【住所又は居所】 京都府京都市下京区中堂寺南町 107 上原マンション  
405

【氏名】 松井 毅

【発明者】

【住所又は居所】 京都府京都市下京区西七条赤社町 32-1102

【氏名】 中山 真由美

【特許出願人】

【識別番号】 000000217

【氏名又は名称】 エーザイ株式会社

【代表者】 内藤 晴夫

【代理人】

【識別番号】 100102978

【弁理士】

【氏名又は名称】 清水 初志

【選任した代理人】

【識別番号】 100108774

【弁理士】

【氏名又は名称】 橋本 一憲

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 041092

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】	要約書 1
【プルーフの要否】	要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 上皮細胞株に対する遺伝子ターゲッティング法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 上皮細胞に対する遺伝子ターゲッティング方法であって、電圧0.4～0.5kVおよびコンデンサー容量125～250 $\mu$ Fの条件によるエレクトロポレーションにより、ターゲッティングベクターを該細胞へ導入することを特徴とする、ターゲッティング方法。

【請求項 2】 エレクトロポレーションへ供される細胞調製液中のカルシウム濃度が5 $\mu$ M以下である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】 ターゲッティングベクターが、細胞の染色体上のZ0-1遺伝子、Z0-2遺伝子、またはDisabled-2遺伝子を標的とするものである、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 4】 ターゲッティングベクターが、外来遺伝子およびZ0-1遺伝子の全領域もしくは部分領域を有するターゲッティングベクターである、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 5】 上皮細胞が高等動物細胞由来である、請求項 1 ～ 4 のいずれかに記載の方法。

【請求項 6】 高等動物がマウスである、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】 細胞がマウス上皮細胞株EpH4である、請求項 6 に記載の方法。

。

【請求項 8】 請求項 1 ～ 7 のいずれかに記載のターゲッティング方法によってターゲッティングベクターを上皮細胞株へ導入することを特徴とする、染色体が人為的に改変された上皮細胞株の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、上皮細胞株、特にマウス上皮細胞株EpH4に対する効率的な遺伝子ターゲッティング方法に関する。

【0002】

**【従来の技術】**

上皮細胞とは、体表面、管腔面等を覆い細胞自身の中に明確な細胞極性を形成して特殊化することにより、それぞれの器官を環境の異なる閉じた空間に分ける機能を果たす一層もしくは数層の細胞シートのことをいう。ヒトの悪性腫瘍の90%以上は上皮細胞に由来することも明らかとなっており、上皮細胞の形成機構、維持機能を解析することは医学的にも重要である。しかし、上皮細胞の形成、機能に重要な遺伝子のノックアウトマウスにおいては発生初期から上皮細胞は形成されるため、詳細な解析は出来ない場合が多い。

**【0 0 0 3】**

従来、遺伝子相同組み換えを応用した遺伝子ターゲッティング法 (gene-targeting; 非特許文献1参照) は主にマウスES細胞で行われているが、分化した体細胞における相同組み換えの効率は非常に低いことが知られている (非特許文献2参照)。

**【0 0 0 4】**

従って、上皮細胞に対する遺伝子ターゲッティングは極めて困難であり、これまでのところ、上皮細胞を対象とする効率的な遺伝子ターゲッティング方法は知られていなかった。

**【0 0 0 5】****【非特許文献1】**

A.L.Joyner 著、「Gene Targeting Second Edition」、オックスフォード大学出版 (OXFORD University Press)

**【0 0 0 6】****【非特許文献2】**

Sedivy JMおよびDutriaux A著、「Gene targeting and somatic cell genetics-a rebirth or a coming of age?」、Trends Genet.、1999年、Vol.15、p.88-90

**【0 0 0 7】****【発明が解決しようとする課題】**

本発明は、このような状況に鑑みてなされたものであり、その目的は、上皮細胞株、特にマウス上皮細胞株EpH4に対する効率的な遺伝子ターゲッティング方法

を提供することにある。

#### 【0008】

##### 【課題を解決するための手段】

本発明者らは、上記課題を解決すべく鋭意研究を行った。まず、本発明者らは、マウスZ0-1遺伝子等の遺伝子座に対する高効率ターゲッティングベクターを開発した。そして、該ベクターを用いて上皮細胞に対するエレクトロポレーションの至適条件の検討を行った。その結果、上皮細胞株であるマウスEpH4に対して効率的な遺伝子ターゲッティングが可能なエレクトロポレーションの至適条件を決定し、本発明を完成させた。

#### 【0009】

これまでは体細胞での遺伝子ターゲッティング効率は非常に低いとされていたが、本発明による遺伝子導入条件の至適化により、上皮細胞株EpH4においてもES細胞と同頻度で相同組み換えが起こることが示された。

#### 【0010】

本発明の方法を用いることにより、上皮細胞において発現している遺伝子の機能を効率的に解析できることものと期待される。また、悪性腫瘍形成に関わる遺伝子を破壊する、もしくは該遺伝子の変異体をノックインによりゲノム上に導入することができるため、遺伝子改変を行った上皮細胞における薬剤スクリーニング系の開発が可能になるものと考えられる。

#### 【0011】

即ち本発明は、上皮細胞、特にマウス上皮細胞株EpH4に対する遺伝子ターゲッティング方法に関し、より具体的には、

〔1〕 上皮細胞に対する遺伝子ターゲッティング方法であって、電圧0.4～0.5 kVおよびコンデンサー容量125～250  $\mu$ Fの条件によるエレクトロポレーションにより、ターゲッティングベクターを該細胞へ導入することを特徴とする、ターゲッティング方法、

〔2〕 エレクトロポレーションへ供される細胞調製液中のカルシウム濃度が5  $\mu$ M以下である、〔1〕に記載の方法、

〔3〕 ターゲッティングベクターが、細胞の染色体上のZ0-1遺伝子、Z0-2遺伝

子、またはDisabled-2遺伝子を標的とするものである、〔1〕または〔2〕に記載の方法、

〔4〕 ターゲッティングベクターが、外来遺伝子およびZ0-1遺伝子の全領域もしくは部分領域を有するターゲッティングベクターである、〔1〕または〔2〕に記載の方法、

〔5〕 上皮細胞が高等動物細胞由来である、〔1〕～〔4〕のいずれかに記載の方法、

〔6〕 高等動物がマウスである、〔5〕に記載の方法、

〔7〕 細胞がマウス上皮細胞株EpH4である、〔6〕に記載の方法、

〔8〕 〔1〕～〔7〕のいずれかに記載のターゲッティング方法によってターゲッティングベクターを上皮細胞株へ導入することを特徴とする、染色体が人為的に改変された上皮細胞株の製造方法、を提供するものである。

#### 【0012】

##### 【発明の実施の形態】

本発明は、上皮細胞に対して効率的に遺伝子ターゲッティングを行うことが可能な方法を提供する。

#### 【0013】

「遺伝子ターゲッティング」とは、同じ塩基配列を有するDNA分子間で起こる相同組み換えという現象を利用して、人為的に染色体上の遺伝子を改変することを言う。この「改変」には、遺伝子破壊もしくは遺伝子挿入が含まれる。つまり、染色体上の標的配列と相同的な配列を有するベクターを細胞へ導入することにより、相同部分で組み換えが起こり、ベクター（もしくは、その一部）が染色体へ挿入される。該ベクターの細胞への導入は、種々の方法が知られているが、最も一般的な方法としては、エレクトロポレーション法を挙げることができる。エレクトロポレーション法は、当業者においては一般的に市販されている機材を利用して、適宜、実施することができる。

#### 【0014】

本発明の方法は、エレクトロポレーションによってターゲッティングベクターを上皮細胞へ導入する工程を含む遺伝子ターゲッティング方法である。

## 【0015】

本発明の方法においてエレクトロポレーションは、バイオ・ラッド社のジーンパルサーシステムII（パルスコントローラーPLUS使用）を用いて好ましくは電圧0.4～0.5kV、コンデンサー容量125～250 $\mu$ F、更に好ましくは電圧0.45kVもしくはその近辺、コンデンサー容量125 $\mu$ Fもしくはその近辺の条件で行う。これらのエレクトロポレーションの条件は、上皮細胞に対して高効率に遺伝子ターゲッティングを行うことが可能な条件として、本発明者らによって初めて決定されたものである。

## 【0016】

また、エレクトロポレーションに供される細胞（培養液）の調製方法もまた、当業者においては一般的に公知の種々の方法によって適宜実施することができる。例えば、エレクトロポレーションに供される細胞は、カルシウムを添加することによって調製することができる。細胞間接着が強固な細胞の場合、細胞調製時にカルシウム濃度を下げてエレクトロポレーションを行うことにより、遺伝子導入効率が上昇することが本発明者らの研究により明らかとなった（後述の実施例2参照）。従って、細胞調製時の細胞培養液中に含まれる最終カルシウム濃度は、特に限定されるものではないが、好ましくは5 $\mu$ M以下である。

## 【0017】

また、本発明の方法に使用されるターゲッティングベクターは、必要に応じて外来遺伝子を含み、該外来遺伝子が挿入される染色体部位（標的部位）の両脇のDNA領域と相同な塩基配列からなるDNA断片が、該外来遺伝子の両脇に配置された構造を持つベクターである。該ベクターを細胞へ導入すると、外来遺伝子の両脇の相同DNA領域と、標的部位の両脇のDNA領域との間で、相同組み換えが起こり、外来遺伝子が染色体上の標的部位へ挿入される。

## 【0018】

本発明のターゲッティングベクターの好ましい態様としては、上皮細胞の染色体上のZO-1遺伝子（GenBankアクセッション番号：NM\_009386）、ZO-2遺伝子（GenBankアクセッション番号：NM\_011597）、またはDisabled-2遺伝子（GenBankアクセッション番号：NM\_023118）を標的とするものであるが、これらに特に制限されるも



のではなく、上皮細胞の染色体上の任意のDNA領域を標的とするように構築することができる。マウスZO-1遺伝子の塩基配列を配列番号：1に示す。

#### 【0019】

また、本発明のターゲッティングベクターは、上皮細胞の染色体上の標的となる遺伝子の全領域もしくは部分領域を有するものである。本発明のターゲッティングベクターとして、例えば、外来遺伝子およびZO-1遺伝子の全領域もしくは部分領域を有するベクター（「ZO-1ベクター」と記載する場合あり）を挙げることができる。本発明のターゲッティングベクターの一例として、ZO-1ベクターについて、より詳細に記述するが、特に該ベクターに限定されるものではない。

#### 【0020】

外来遺伝子の挿入の標的となり得る染色体上のDNA部位は、通常、ZO-1遺伝子上の部位であり、エクソン、イントロン、またはプロモーター等の遺伝子発現制御領域であってもよい。ZO-1ベクターは、例えば、外来遺伝子上流および／または下流に、ZO-1遺伝子の全領域もしくは部分領域が配置された構造を有する。また、外来遺伝子はZO-1遺伝子上であれば任意の領域へ挿入することが可能であるが、好ましくは、ZO-1遺伝子の第2エクソンまたは第2エクソンの一部を含むDNA領域へ挿入される。従って、ZO-1ベクターに含まれるZO-1遺伝子の領域としては、例えば、ZO-1遺伝子の第2エクソン全体もしくは第2エクソンの一部を含むようなZO-1遺伝子上のDNA領域であることが好ましい。上記の第2エクソンの一部を含むDNA領域の具体例としては、第2エクソンの一部およびその上流を含む1.5-kbのBsp1286I-Bsp1286I断片、および第2エクソンの下流の8.5-kbのPstI-BamHI断片を挙げることができるが、これに限定されない。ZO-1ベクターの例としては、上記の2つの断片がそれぞれ、外来遺伝子上流部または下流部に配置された構造を有するベクターを示すことができる。

#### 【0021】

また、本発明のベクターの一例をとっては、ZO-2遺伝子を標的とするターゲッティングベクター（ZO-2ベクター）を挙げることができる。ZO-2ベクターは、外来遺伝子および／またはZO-2遺伝子の全領域もしくは部分領域を有するベクターであり、より具体的には、該ZO-2ベクターは、ZO-2遺伝子の第3エクソンを欠損す

るように該遺伝子領域を含むベクターである。該ベクターは、例えば、第3エクソンの上流の6.6-kbのKpnI-HindIII断片、および第3エクソン下流の2.6-kbのScaI-SpeI断片を用いて作製される。

#### 【0022】

また、本発明のベクターとして、例えば、Disabled-2遺伝子を標的とするターゲティングベクター(Disabled-2ベクター)を挙げることができる。Disabled-2ベクターは、例えば、外来遺伝子および/またはDisabled-2遺伝子の全領域もしくは部分領域を有するベクターである。より具体的には、該Disabled-2遺伝子の第3エクソンを欠損するように該遺伝子領域を含むベクターである。該ベクターは、例えば、第3エクソンの上流および下流それぞれ3.9-kbの断片を上皮細胞株E pH4のゲノムDNAを鋳型としたゲノミック(genomic) PCRにより取得することができる。その際、上流断片の3'側にEcoRVサイトを導入し、この新たに導入したサイトを利用することにより、サザンブロットを行うことが可能である。

#### 【0023】

本発明の上記外来遺伝子は、必ずしも制限されるものではないが、通常、タンパク質を発現し得る(タンパク質をコードする)遺伝子である。上記したベクターによって発現させるタンパク質としては、天然または人工タンパク質であるかを問わず、所望のタンパク質を挙げることができる。天然のタンパク質としては例えば、分泌タンパク質、膜タンパク質、細胞質タンパク質、核タンパク質、ホルモン、サイトカイン、増殖因子、受容体、酵素、ペプチド等を挙げられる。人工タンパク質としては、例えば、キメラ毒素などの融合タンパク質、ドミナントネガティブタンパク質(受容体の可溶性分子または膜結合型ドミナントネガティブ受容体を含む)、欠失型の細胞接着分子および細胞表面分子等が挙げられる。また、分泌シグナルや膜局在化シグナル、核移行シグナル等を付加したタンパク質であってもよい。また、アンチセンスRNA分子またはRNA切断型リボザイム等を発現させることにより、細胞における発現が望ましくない遺伝子について、その発現を抑制する、または遺伝子産物の機能を抑制することもできる。

#### 【0024】

本発明の上記外来遺伝子は、該遺伝子が転写し得るようにプロモーターと機能

的に結合した構造、所謂「発現カセット」であることが好ましい。上記「機能的に結合した」とは、プロモーターの転写の活性化に伴い、下流の遺伝子の発現が誘導されるようにプロモーターと下流の遺伝子が結合していることを言う。

#### 【0025】

上記プロモーターとしては、遺伝子自体に本来備わっているプロモーターを挙げることができるが、これ以外にも、発現させたい外来遺伝子の種類、および外来遺伝子を導入する細胞の種類等を考慮して、当業者においては公知のプロモーターから適宜選択して使用することができる。具体的には、サイトメガロウイルス(CMV)由来プロモーター、EF-1 $\alpha$ プロモーター、 $\beta$ アクチンプロモーター、ラウス肉腫ウイルス由来(RSV)プロモーター、SV40プロモーター、TKプロモーター、PGKプロモーター、SR $\alpha$ プロモーター等を例示することができるが、特にこれらに制限されない。

#### 【0026】

上記ベクターに含まれる標的となる遺伝子領域と相同なDNA（単に、「相同DNA」と記載する場合あり）の長さは、相同組み換えが生じ得る長さであれば特に制限されない。一般的に、相同領域は長いほど相同組み換えの効率が高いことが知られていることから、本発明のベクターに含まれる標的となる遺伝子領域と相同なDNA領域も長いことが好ましい。通常、哺乳動物細胞の相同組み換えには、外来遺伝子両脇の「相同DNA」の合計が5-kb以上、少なくとも片側の長さは0.5~2-kb以上が好ましいとされている。従って、ベクターに含まれる「相同DNA」の長さは、通常、合計5-kb以上であり、外来遺伝子両脇に位置する「相同DNA」の長さは、片側において好ましくは0.5-kb以上、より好ましくは2-kb以上である。

#### 【0027】

また、染色体へ外来遺伝子が導入された細胞を選択するため、または外来遺伝子が導入されたことを確認するために、本発明におけるベクターは、マーカー遺伝子発現カセットを含むことが好ましい。「マーカー遺伝子発現カセット」とは、マーカー遺伝子が発現し得るようにプロモーターと機能的に結合した構造を有するDNA断片を指す。

#### 【0028】

上記「マーカー遺伝子」としては、例えば、ネオマイシン耐性遺伝子(neo)等の薬剤耐性遺伝子を利用することができる。薬剤耐性遺伝子を挿入した場合には、薬剤を含む培地で培養することにより相同組み換えを生じた細胞株を選抜することができる。具体的には、マーカー遺伝子として、ネオマイシン、ハイグロマイシン、ピューロマイシン等を好適に使用することができる。

#### 【0029】

また、上記ベクターが上記マーカー遺伝子発現カセットを含む場合、該ベクターは、該発現カセットの下流(3'側)に外来遺伝子が隣接して配置された構造であることが好ましいが、必ずしもこの構造に制限されるものではない。また、本発明の「外来遺伝子」が上記マーカー遺伝子発現カセットであってもよい。

#### 【0030】

また本発明のターゲッティングベクターには、標的となる遺伝子の全領域もしくは部分領域を有し、外来遺伝子を含まないベクターも含まれる。前記ベクターは、外来遺伝子、および必要に応じてマーカー遺伝子発現カセットを容易に挿入できるようにするために、挿入部位にクローニングサイトを設計することができる。該クローニングサイトは、例えば制限酵素の認識配列とすることができる。これにより、該制限酵素部位に外来遺伝子、および必要に応じてマーカー遺伝子発現カセットを挿入することができる。クローニングサイトは、複数の制限酵素認識配列を有する、いわゆるマルチクローニングサイトとしてもよい。これらのクローニングサイトの設計および構築は、当業者においては、一般的な遺伝子工学技術を用いて行うことが可能である。

#### 【0031】

さらに上記ベクターは、細胞へ導入された際にベクターを含む細胞を選択するために、必要に応じて上記マーカー遺伝子とは異なる種類の複数のマーカー遺伝子を備えたものであってもよい。

#### 【0032】

本発明の方法に用いられるターゲッティングベクターの基本骨格は、特に制限はなく、例えば、pBluescript、pGEM vector (製造元プロメガ株式会社)、pUC vector (製造元タカラバイオ株式会社)等の市販のベクターを適宜利用すること

ができる。当業者においては、例えば、市販のベクターを利用して、一般的な遺伝子工学技術によりターゲッティングベクターの構築が可能である。

#### 【0033】

本発明の遺伝子ターゲッティング方法に供される細胞としては、例えば、高等動物細胞を好適に示すことができる。高等動物細胞としては、例えば、マウス、イヌ、ラット、ハムスター、ウサギ、ブタ、ウシ、ウマ、ニワトリ、サル、ヒツジ、ヤギ、ネコ等を挙げることができる。

#### 【0034】

本発明の遺伝子ターゲッティング方法に供される細胞の具体例としては、マウス上皮細胞株EpH4、MTD-1A株 (Enami, J., S. Enami, and M. Koga. 1984. Isolation of an insulin-responsive preadipose cell line and a mammary tumor-producing, dome-forming epithelial cell line from a mouse mammary tumor. Dev. Growth Differ. 1984; 26: 223-234)、CSG211株 (Wigley CB and Franks LM. Salivary epithelial cells in primary culture: Characterization of their growth and functional properties. J Cell Sci. 1976; 20: 149-165) 等を示すことができるが、最も好ましくはマウス上皮細胞株EpH4である。または、これらの細胞に由来する細胞もまた好適に使用することができる。

#### 【0035】

本発明の方法の好ましい態様においては、通常、本発明のターゲッティングベクターを上記の条件のエレクトロポレーションによって上皮細胞へ導入した後、該細胞の培養を行う。次いで、相同組み換えによって外来遺伝子が染色体へ挿入された細胞を、適宜マーカー等を利用して選択する。

#### 【0036】

本発明の遺伝子ターゲッティング方法は、例えば、外来遺伝子導入細胞の作製に利用することができる。本発明の方法によって染色体へ挿入された外来遺伝子の発現量は、当業者に公知の方法によりアッセイすることが可能である。遺伝子の転写産物は、例えば、ノーザンハイブリダイゼーション、RT-PCR、RNAプロテクションアッセイ等により検出することができる。ノーザンハイブリダイゼーションやRT-PCR等による検出は in situでも行うことが可能である。また、翻訳産

物を検出するには、抗体を用いたウェスタンブロット、免疫沈降、RIA、ELISA、プルダウンアッセイ等により行うことができる。さらに、遺伝子導入の検出を容易にするため、発現させるタンパク質にタグを付加したり、外来遺伝子に加えてレポーター遺伝子を発現するようにベクターを構築することも可能である。レポーター遺伝子は、 $\beta$ ガラクトシダーゼ、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ(CAT)、アルカリホスファターゼ、またはGFP(Green Fluorescent Protein)をコードする遺伝子等が挙げられるがこれらに特に制限されず、当業者においては、細胞の種類等を考慮し、適当なレポーター遺伝子を適宜選択することができる。

本発明は、本発明のターゲッティング方法によってターゲッティングベクターを上皮細胞株へ導入することを特徴とする、染色体が人為的に改変された上皮細胞株の製造方法を提供する。本発明のターゲッティング方法によって導入されたターゲッティングベクターは、上皮細胞株へ導入された後、通常、上皮細胞染色体との間で相同組換えにより該ベクターもしくは該ベクターの一部が染色体へ挿入される。上記「染色体が人為的に改変された上皮細胞株」には、外来遺伝子が染色体へ挿入された上皮細胞株、あるいは内因性の遺伝子が改変された上皮細胞株等が含まれる。この改変とは、例えば、DNAの挿入、付加、欠失、置換等が挙げられる。

### 【0037】

#### 【実施例】

以下、本発明を実施例により具体的に説明するが、本発明はこれら実施例に制限されるものではない。

### 【0038】

#### 〔実施例1〕 各種高効率ターゲッティングベクターの作製

##### (1) ZO-1ターゲッティングベクターの作製

ZO-1がコードされたゲノムを得る為に、 $\lambda$ ファージ129/Svマウスジェノミックライブラリーに対して、マウスZO-1 cDNA プロンプを用いてスクリーニングし、4つの重複するゲノム断片を得た。制限酵素によるマッピングとDNAシーケンスにより、マウスZO-1のgenomic locusを決定した。取得したZO-1遺伝子を含むゲノ

ム断片は4個のエクソンからなり、第1エクソンに開始コドンが存在していた。

#### 【0039】

Z0-1ターゲッティングベクターは第2エクソンの一部を除く形で設計した。このベクターはカセットとして、ネオマイシンカセット(順にLacZ,  $\beta$ -geo, poly A)を含んでいる。第2エクソンの一部およびその上流を含む1.5-kbのBsp1286I-Bsp1286I断片と、第2エクソン下流の8.5-kbのPstI-BamHI断片を、上記カセットの上流部、下流部にそれぞれライゲーションした(図1)。このターゲッティングベクターにより、相同組み換えがターゲッティングベクターとZ0-1遺伝子の間に起こると、第2エクソンの一部を含む領域が除かれる。

#### 【0040】

(2) Z0-2ターゲッティングベクターは、第3エクソンを除く形で設計した。このベクターは、カセットとしてネオマイシンカセット(順にIRES (Internal ribosome entry site),  $\beta$ -geo, polyA)を含んでいる。第3エクソンの上流の6.6-kbのKpnI-HindIII断片、および第3エクソン下流の2.6-kbのScaI-SpeI断片を、上記カセットの上流部、下流部にそれぞれライゲーションした(図2および3)。このターゲッティングベクターにより、相同組み換えがターゲッティングベクターとZ0-2遺伝子の間に起こると、第3エクソンを含む領域が除かれる。

#### 【0041】

(3) Disabled-2ターゲッティングベクターは、第3エクソンを除く形で設計した。このベクターは、Z0-1と同様にカセットとしてネオマイシンカセット(順にIRES,  $\beta$ -geo, polyA)を含んでいる。第3エクソンの上流および下流それぞれ3.9-kbの断片を上皮細胞株EpH4のゲノムDNAを鋳型としたゲノミック(genomic) PCRにより取得し、それぞれ上記カセットの上流部、下流部にそれぞれライゲーションした(図4および5)。その際、上流断片の3'側にEcoRVサイトを導入し、この新たに導入したサイトを利用することにより、サザンブロット解析を行った。このターゲッティングベクターにより、相同組み換えがターゲッティングベクターとDisabled-2遺伝子の間に起こると、第3エクソンを含む領域が除かれる。

#### 【0042】

【実施例2】 遺伝子ターゲッティングのためのエレクトロポレーションの条件

## 検討

マウス上皮細胞株EpH4に対する遺伝子ターゲッティング法を開発する為に、実施例1に記載の高効率Z0-1ターゲッティングベクターを用いてエレクトロポレーションの条件検討を行った。

マウスZ0-1に対するターゲッティングベクターは3' 相同領域断片の3' 側に存在するuniqueサイトのXhoIで直線化 (linearize) した。このDNA (10 $\mu$ g) を12時間、低Ca<sup>2+</sup>培地 (5 $\mu$ M) で培養したマウス上皮細胞株EpH4 (1x10<sup>7</sup> cells) に対してバイオ・ラッド社のジーンパルサーIIシステム (パルスコントローラーPLUS 使用) を用いて、電圧、コンデンサー容量等の様々な条件でエレクトロポレーションを行い遺伝子導入した (図1)。導入後、通常培地中で、48時間培養後、0.4mg/mlのG418を含む培地中で14日培養し、選抜をした。その結果、各条件に応じてG418耐性コロニーの数に違いが認められた (図6)。このことは条件に応じてターゲッティングベクターの導入効率が異なることを示している。

### 【0043】

次に各条件に応じたG418耐性コロニーを分離し増やしたものからゲノムを抽出し、5' 側相同領域断片の外側に対するゲノム断片 (280bp) を用いたサザンブロットを行った。その結果、最も良く相同組変えが起こっていた条件は、0.45kV、125 $\mu$ Fであった (表1)。

### 【0044】



【表 1】

電圧量, コンデンサ容量	ヒット数/試験クローン全数	ターゲッティング効率 (%)
0.25kV, 125 F	0 / 6	0
0.25kV, 250 F	0 / 9	0
0.25kV, 950 F	1 / 18	5.5
0.35kV, 125 F	1 / 12	8.3
0.35kV, 250 F	1 / 31	3.2
0.35kV, 950 F	0 / 6	0
0.45kV, 125 F	4 / 46	8.6
0.45kV, 250 F	3 / 55	5.4
0.45kV, 950 F	0 / 0	0

## 【 0 0 4 5】

この条件はES細胞における至適条件とは異なっていた。

この条件で再度Z0-1遺伝子座に対して遺伝子ターゲッティングを行った所、14クローン中16クローンで(11.2%) 相同組み換えが確認された。正しく相同組み換えが起こったクローンはZ0-1においては、ゲノムをEcoRIで消化すると、野生型の20.9-kbのバンドに加え新たに5.3-kbのバンドが現れた(図7)。

## 【 0 0 4 6】

## 【発明の効果】

本発明の方法を用いることにより、上皮細胞において発現している遺伝子の機能を解析することが可能である。また、悪性腫瘍形成に関わる遺伝子を破壊もしくはその変異体をノックインにより効率的にゲノム上に導入することができるため、遺伝子改変を行った上皮細胞を利用した薬剤スクリーニング系の開発が可能になるものと考えられる。

## 【 0 0 4 7】

## 【配列表】

## SEQUENCE LISTING

<110> Eisai Co., Ltd.

<120> Method for high efficient gene-targeting in epithelial cell line

<130> E1-A0205

<140>

<141>

<160> 1

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 7046

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 1

cgcttgagtt gcccgcgacg gctctgcccg ccgacggcac gtctctcggc ggccgcgcgt 60  
tccggggaag ttacgtgcgg gagcaggctt tggaggagac gcccgagggt gtaggggaca 120  
gccggaggcc cgggtactgc ggagcggcga gccggcggag ggcggcggag gccgagcagg 180  
cggccgggtg tgccccgcgg agaagcccgg gcggggcgga cgcttcccgg acttttgtcc 240  
cacttgaatc ccctccccgt gggccgggccc tttccggcct cccccgcccc tgccccgctc 300  
gtccccggga gatgtttatg cggacggtgg cgtgaggagc gggcgggccc gcggcgcgga 360  
gtttcgggtc cgaggagctt cgcgcggcgc ggagagagac aagatgtccg ccagggccgc 420

ggccgctaag agcacagcaa tggaggaaac agctatatgg gaacagcaca cagtgcgct 480  
tcacagggct cctgggtttg gatitggaat tgcaatctct ggtggaagag ataatcctca 540  
ttttcagagt ggggaaacct ccatagtgat ttctgatgtg ttaaaaggag ggccagctga 600  
aggacagcta caggaaaatg accgagttgc aatggttaac ggagtttcaa tggataacgt 660  
tgaacatgct ttigtgttgc agcagctaag gaagagtggg aaaaacgcaa aaattactat 720  
ccgaaggaag aagaaagttc agatccctgt aagtcacca gatcctgagc cgggtgtctga 780  
taatgaagac gatagttatg acgaagaagt gcatgacca agagctggcc gcggtgtctt 840  
agcgaacaga aggagcgaga agagctgggc aagggatagg agtgcaagca gggagaggag 900  
cctgtcccct cgctcggaca ggcggtccgt ggctccagt cagcccgcaa agcccaccaa 960  
gtcacactg gtgaagtctc ggaaaaatga agaatatggt cttcgaccgg ccagccacat 1020  
atttgtaaag gaaatttcac aagatagttt ggcagcaaga gatggtgaca ttcaagaagg 1080  
ggatgttgct ttgaagataa atgggtactgt gacagaaaat atgtcattga cagatgcaaa 1140  
aacactgata gaaaggtcta aaggcaagtt aaaaatggta gtgcaaagag atgagcgggc 1200  
taccttactg aacgtccctg acctttcgga tagtatccat tctgctaata cctcggaaag 1260  
agatgacatt tcagaaattc agtcactagc gtcagaccat tcaggtcgct cgcatgacag 1320  
gccacccgc cgagccagt cacgatctcc tgaccaacgt tcagagccct ccgatcattc 1380  
cacgcagtct ccacagcagc ccagcaatgg cagtctccgg agcagagagg aagagcgaat 1440  
gtctaaacct ggggccatct caactcctgt aaaacatgta gacgatcatc cacccaaagc 1500  
agtggaagaa gttacagttg agaaaaatga gaagcagacg cccactcttc cagaaccgaa 1560  
acctgtgtat gtcgaagttg gacaaccaga tgtggattta cccgtcagcc cttctgatgg 1620  
tgctctgcct aattcagctc atgaagacgg gatacttagg cccagcatga aactggtaaa 1680  
attcagaaaa ggagatagtg tgggtttgcg actagctggt ggaaatgatg tcggaatatt 1740  
tgtagctggc gttctagaag atagccctgc agccaaagaa ggcttagagg aaggtgatca 1800  
aattctcagg gtgaacaatg tagatttcac aaatatcata agggaagagg ccgtcctttt 1860  
cctccttgac ctccctaaag gtgaagaagt gaccatactg gtcagaaga agaaggacgt 1920  
ttatgccgc attgtagaat cagatgtagg agattcattc tatattagaa cgcattttga 1980  
atatgaaaaa gaatctcctt acggacttag ttttaacaaa ggagaggtgt tccgggtcgt 2040  
ggatacttta tacaatggaa agctgggctc ttggcttgcc attcgaattg gcaaaaatca 2100  
taaggaggta gaacgaggca tcatcccaa taagaacaga gctgaacagt tagccagtgt 2160

acagtacaca cttccaaaga cagcgggtgg tgatcgggca gacttctgga ggtttcgagg 2220  
 tcttcgcagc tccaagagaa atcttcgaaa aagcagagag gacttgtcag ctcagccagt 2280  
 tcaaaactaag ttcccgactt atgaaagggt tgttcttcga gaagctggat tcctaagacc 2340  
 tgtaaccatc tttggacca tagctgatgt tgccagagaa aagttggcaa gagaggagcc 2400  
 agatatctat cagattgcaa aaagtgaact acgagacgct gggactgacc atcgtagctc 2460  
 tggcatcatt cgccttcata caataaagca aatcatagat caggataaac atgctttatt 2520  
 agatgtaacg ccaaagcgg ttgatcgtct taattatgcg cagtgggtatc caattgttgt 2580  
 gticcttaac cctgactcta agcaagggtg aaaaacaatg aggatgaggt tgtgtccgga 2640  
 gtctcggaaa agcgcagga agctatatga acgctctcat aagcttcgta agaacaatca 2700  
 ccatctcttc acaactacaa ttaacttaaa ctcaatgaat gatggtttgt acggtgccct 2760  
 gaaagaagcg attcagcagc aacagaacca gctgggtgtg gtctctgagg ggaaggcgga 2820  
 tgggtgctaca agtgatgacc ttgatttgca tgacgatcgt ctgtcctacc tgtcagcccc 2880  
 aggtagttag tactcaatgt atagcacgga cagtagacac acttctgact atgaagacac 2940  
 agatacagaa ggcggggcct acactgatca agaactagat gaaactctta atgatgaggt 3000  
 ggggactccc ccggagtctg ccattacacg gtcctctgag cctgtaagag aggattcctc 3060  
 tggaatgcat catgaaaacc agacataccc tccttactca ccacaagcg agccacaagc 3120  
 tattcataga atagactccc ctggacttaa gccagcctct caacagaaag cagaagcctc 3180  
 atctccagtc cttaccttt cgcctgaaac aaccccagca tcatcagcct ctgcagttaa 3240  
 tcataatgtc agtgtaacta atgtcagcct ggaggagcct gcccagccc ctcccacctc 3300  
 gcacgcatca cagcctgggt gtttaggagc accaagtgtc gaggcagctc acgtaggtct 3360  
 cagaggtgaa ggaccacat tgccgccgca tgcagacca gcaaagggtg acaggaagga 3420  
 gccatattct gaagaaatga tgagacaaaa ccatatttta aaacaaccag ctcttggtca 3480  
 cccagggcag aggccagata aagagccaaa tctagcctat gaaccccaac ttccatatat 3540  
 agaaaaacaa gccagcagag accttgagca gccgtcatac aggtatgagg tctcaagcta 3600  
 cacagaccag ttttctcgga actatgacca tcgcctacgg tttgaagatc gaatccctac 3660  
 ctatgaagac cagtgggtcat attatgatga caaacagccc taccaacctc ggccctttga 3720  
 gaatcagcat ccccgagacc tggactccag acaacatccc gaagaggctt cagaacgagg 3780  
 ttatttccag cgttttgaag agccagcccc tctgtcgtac gacagtagaa cacgctatga 3840  
 gcagctgcct cgaacctcta ctctacgaca tgaagagcag ccagcccctg catatgaggt 3900

gcacaacagg tacaggccag aggcacagcc ctattcttca acaggcccta agtcatctga 3960  
gccaagcag tactttgacc agtaccgcg aagtatgag caagttccac caccaggctt 4020  
tacctccaaa acaggccatt acgagcctct ccatgggtgct gcagttgtcc ctctctgat 4080  
accttctct caacaaaagc cagaagtcct gcgctcggct accaaaccac agcctccacc 4140  
cccaacccta actgaggagg aggaggatcc agcaatgaaa ccacagtctg tgctcaccag 4200  
agtcaaaatg tttgaaaaca aaagatctgc gtctttggag aacaagaaag atgtgaatga 4260  
cactgccagc ttcaagcctc cggaagtagc atctaaacct ccagggtgctt ctcttgctgg 4320  
ccctaaacct gtccctcaga gtcagtttag tgagcacgac aaaacgctct acaggctccc 4380  
agagcctcag aaacctcaag tgaagccacc cgaagatatt gttcgatcaa atcattacga 4440  
ccctgaagag gatgaagaat attaccggaa acagctctcc tactttgacc gaagaagttt 4500  
tgagagcaag ccttctgcac atcttctgc tggccatcac tcagagcctg ctaagccagt 4560  
ccattctcag agccagccca acttccctag ttactcttca aagggaaaac ccgaaactga 4620  
tgctgtggat agatcattca gtgagaaacg ttatgatcca gcccaggcca cgcctcctcc 4680  
tcctccgttg ccctcacagt acagccagcc agtccacct ctgtccagct cttctctcca 4740  
catacattcc aagggcgccc aggggtgaagg caactcagta tcattggatt ttcagaactc 4800  
atatatgtcc aaaccagacc ccccccatc tcagagtaaa ccagcaactt tcagaccacc 4860  
aactcgagaa gacccccctc agactttcta tccgcagaaa agtttcccag acaaagctcc 4920  
agttaacgga gctgagcaga ctcaaaaaac catcactccg gtgtacaatc gattcacacc 4980  
aaagccgtac acaagttctg cccggccatt tgaacgcaaa tttgaaagtc cgaagttcaa 5040  
ccataatctt ctgccaagtg aaactgtaca taaacctgaa ttgtcttcaa aaactccac 5100  
ttccccaaaa actcttatga aagctcatag ttcaacacag cctccagagt ttggcagtgg 5160  
agttgaaact ttctctgttc acacagataa gcctaaatat caaatgaata atatcagcac 5220  
catgcctaaa gctgtccctg tgagtccttc agctgtggaa gaagatgaag atgaggatgg 5280  
tcatactgta gtggctacag ctctgtggcat ttttaacagc aatggtggtg tgttgagttc 5340  
catagaaacc ggtgttagta taattatccc acaaggagcc attcctgaag gaattgagca 5400  
agaaatctat ttcaaagtct gcagagacaa tagcattctc ccacctttag ataaagagaa 5460  
agggtgaaact ctgctgagcc ccctagtgat gtgtgggccc catggcctca agttcctgaa 5520  
gcccgtggag ctacgcttgc cacactgtga ccctaaaacc tggcaaaaca agtgtcttcc 5580  
tggagatccg aattaccttg ttggagccaa ctgtgtttct gtcctgattg accactttta 5640

attccttagtg tataggaact ggactaagca atgtgaacgt ggattgaact tactaaatct 5700  
 aaatggaacc actctaata gttattatatt ttcttagaat ttatactgca attggtagta 5760  
 ttaagcattt gttggaactg atgaaggta gcgagcatgc ccctgagcca cggtcagaaa 5820  
 gcatgctaca agctatgtgt tattgagtga agaactgtca ggcatggct agaggttcaa 5880  
 agatattttt gctttgtaat gatttttgta cttttttatg gtcactgctt aacttcacat 5940  
 actgatttcc gttaaaaata ccagccagta aatgggggtg catttgagtt ctgttctttc 6000  
 caaagtacac tcaaagttta ttatggcctt ggcctagcat acacatttta ttttattata 6060  
 catgaggtaa tgtgcacaca ttttttaca atgcacctgg aatatataac cagtatagtg 6120  
 gatttaacag aaatgtacag cagggggatt tataacttgg ggaggaggagg tcaaataag 6180  
 acaattactt attgtatatg aaaacacatt tcttttaggg aaggacacca aagcatgtga 6240  
 gcccggttca tggcctctga atctataaat taacatatca ccacagacat gtaaccagca 6300  
 ggaatgcctt accctagtgg gtttaattct tccatcattt cgctgtgtat tactaagttt 6360  
 ttatgagttc tgtgcatatc tagatactgt accatggaaa agactgagta gattgtggac 6420  
 ttgatggttt cagaaatgtg caaattacct ggaagaaaat aatgggtgtga cttaaaatat 6480  
 ttttttgaca gggggagtg cagtcttctg ttctttgggc tgtgcatctg agatgtttga 6540  
 tgctttcagg acgcatgtac ataatgcgtg cataccactt ttgttcttgg tttgtaaatt 6600  
 aacttttata aactttacct ttttatacat aaacagaacc aagtttctaa ggctaccttt 6660  
 gtattctctc ctgtacctct tgagccttga actttgacct ctgcagcaat aaagcagcat 6720  
 ttctacacat acaaggatcat ttttctaaga aaaagaatgc acagagttgt tacattttta 6780  
 agtgctgcat ttaaaagata cagttactct agtttgatta aattcttgca aagtatccct 6840  
 tctgtaaaat ttgtgataca atactgtgcc ctaaagtgt tttttttact aatagacagt 6900  
 ttattatggc acatcagcac gatttctggt tagataatac accactacat tctgttaata 6960  
 atcagtaggt gtgaaaggat ttcttttggt gttattaaaa aaaaatctca aatttctaaa 7020  
 tctgcaagaa taaaactttt taaaat 7046

### 【図面の簡単な説明】

**【図 1】** 図 1 は、マウス上皮細胞株EpH4におけるZO-1遺伝子の遺伝子ターゲティングについて、マウスZO-1遺伝子座、ターゲティングベクター、遺伝子破壊後の制限酵素地図を示す。

開始コドンは第2エクソンに存在する。ネオマイシンカセット (LacZ/ $\beta$ -geo/polyA) を中央に含むターゲッティングベクターは第2エクソン一部を除く形で作られている。サザンブロッティングに用いられた5'側プローブを黒線で示した。

【図2】 図2は、マウス上皮細胞株Eph4におけるZ0-2遺伝子の遺伝子ターゲッティングについて、マウスZ0-2遺伝子座、ターゲッティングベクター、遺伝子破壊後の制限酵素地図を示す図である。ネオマイシンカセット (IRES/ $\beta$ -geo/polyA) を中央に含むターゲッティングベクターは第3エクソンを除く形で作られている。サザンブロッティングに用いられた3'側プローブを黒線で示した。

【図3】 図3は、図2で示されるプローブを用いた際のサザンブロッティング解析の結果を示す写真である。

【図4】 図4は、マウス上皮細胞株Eph4におけるDisabled-2遺伝子の遺伝子ターゲッティングについて、マウスDisabled -2遺伝子座、ターゲッティングベクター、遺伝子破壊後の制限酵素地図を示す図である。ネオマイシンカセット (IRES/ $\beta$ -geo/polyA) を中央に含むターゲッティングベクターは第3エクソンを除く形で作られている。サザンブロッティングに用いられた5'側プローブを黒線で示した。

【図5】 図5は、図4で示されるプローブを用いた際のサザンブロッティング解析の結果を示す写真である。

【図6】 図6は、エレクトロポレーションにおける電圧、コンデンサー容量がG418耐性コロニーの数に及ぼす影響を示すグラフである。

Z0-1に対するターゲッティングベクターを様々な電圧、コンデンサー容量で遺伝子導入を行い、G418で選抜し、コロニー形成後その数を計数した。電圧、コンデンサー容量が大きいほどコロニー数が多いことがわかる。

【図7】 図7は、Z0-1シングルノックアウトEph4細胞における遺伝子導入結果を確認するためのサザンブロッティング解析の電気泳動写真である。

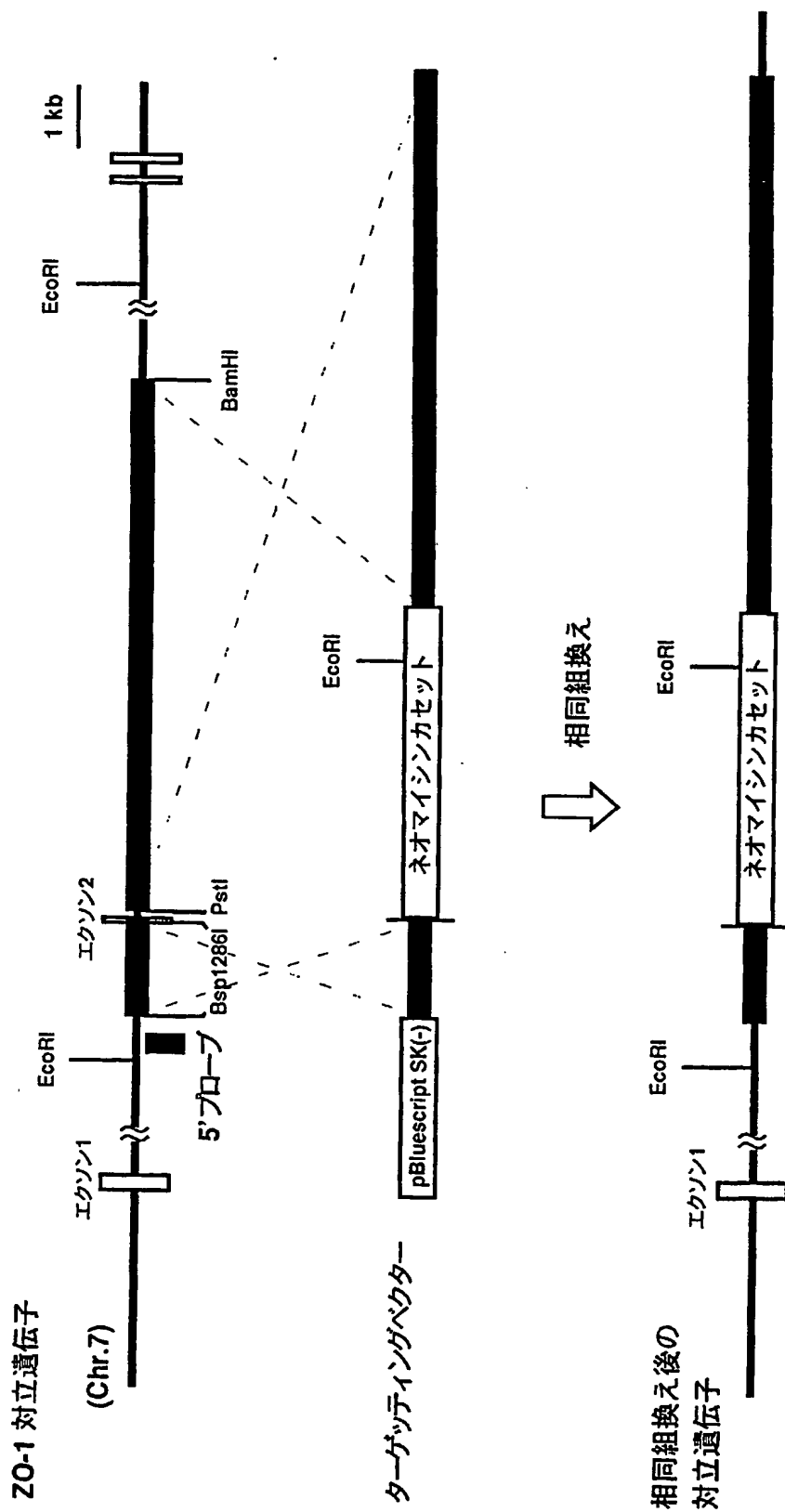
EcoRI消化したZ0-1遺伝子座を5'側プローブでサザンブロッティングした結果、野生型遺伝子座から得られる20.9-kbのバンドと遺伝子破壊後の遺伝子座から得られる5.3-kbのバンドが得られた(レーン1、2、11、12)。142個のG418耐性

コロニーの中で、相同組み換えが一度起こっていたクローンは16個であった。

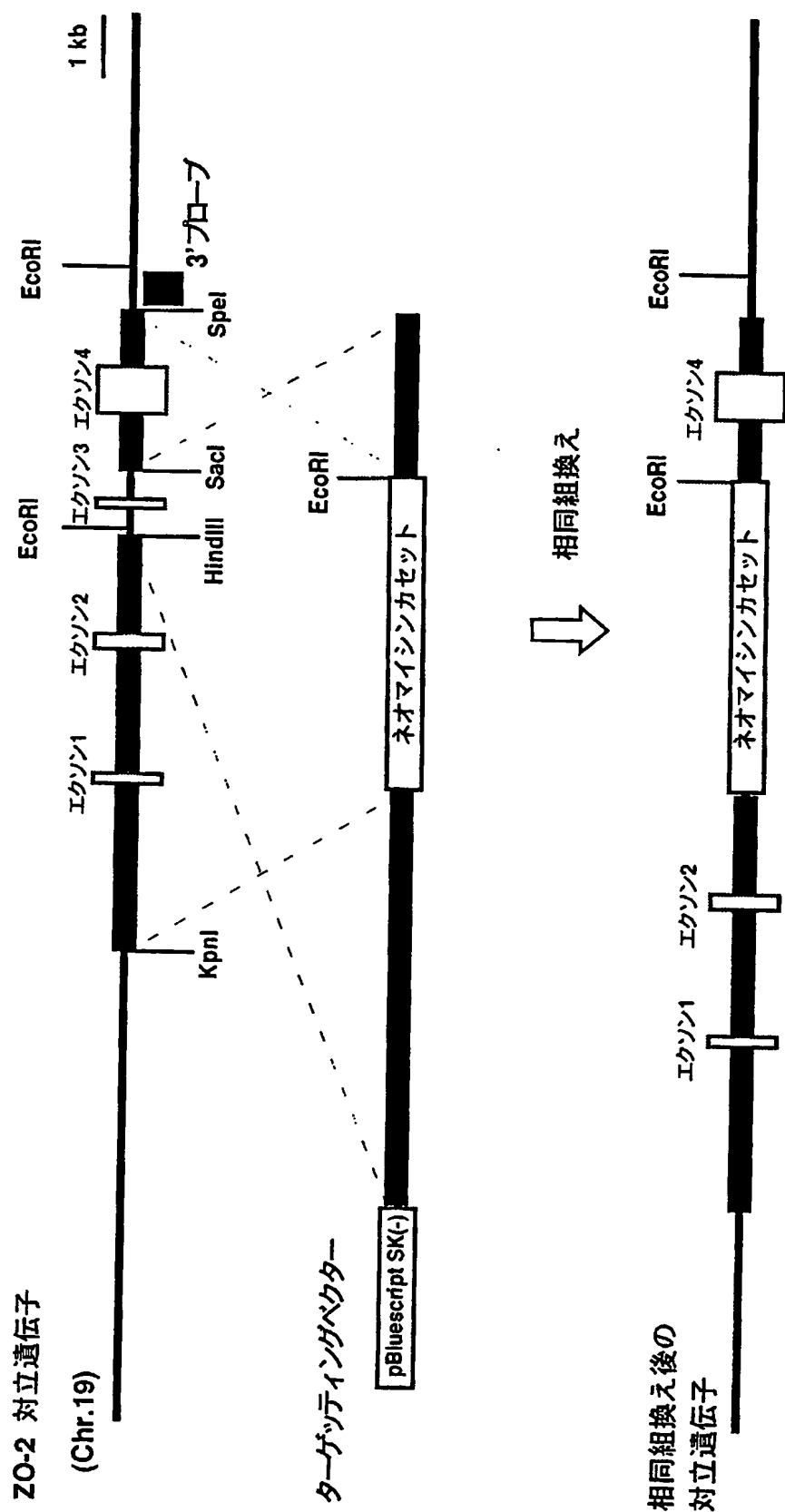


【書類名】 図面

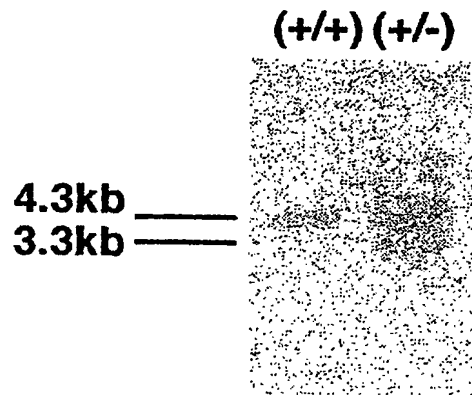
【図1】



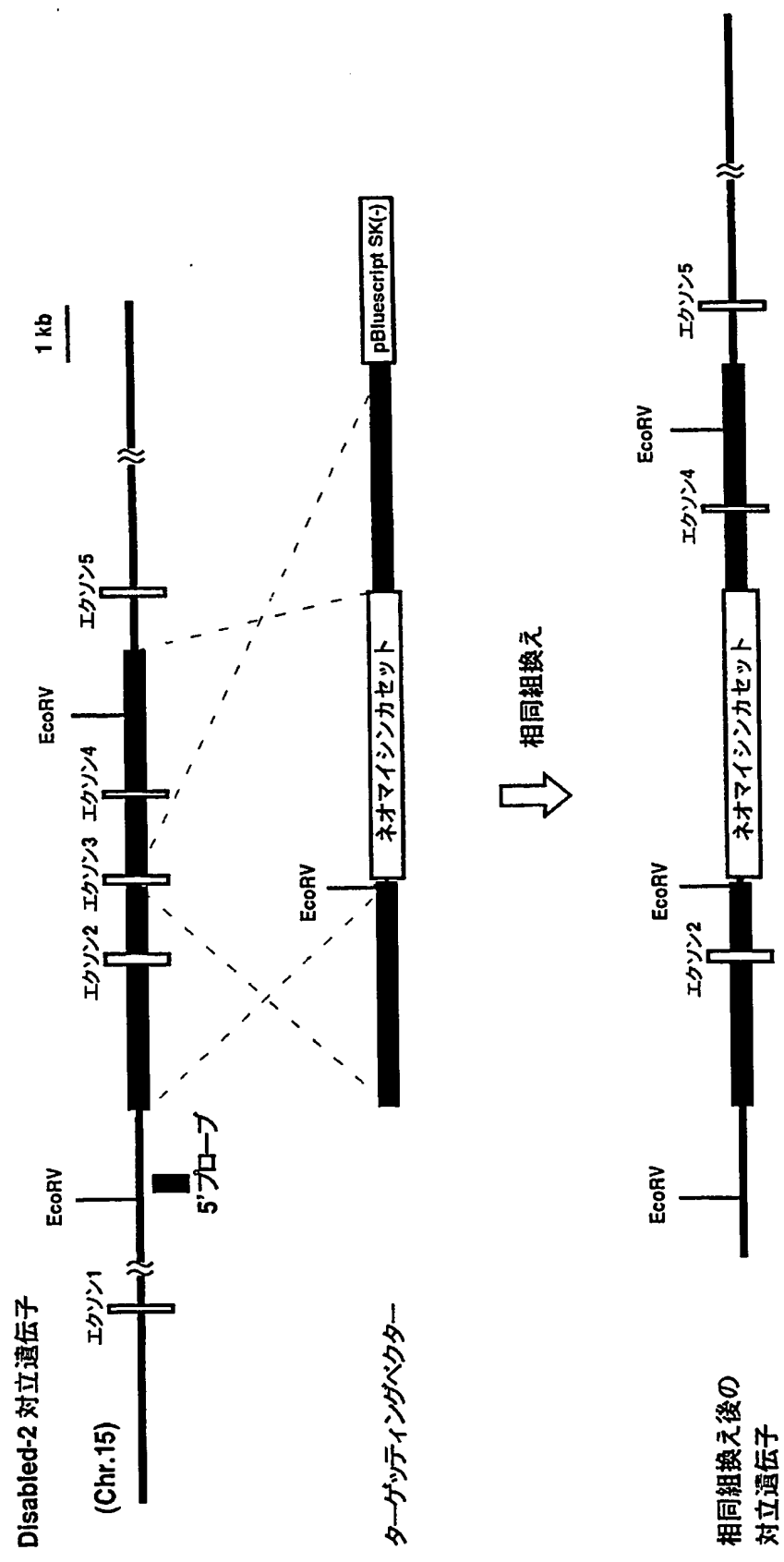
【図 2】



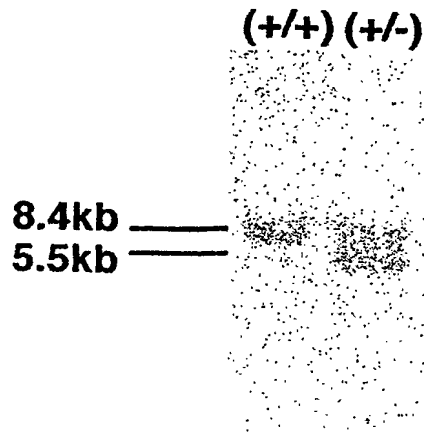
【図 3】



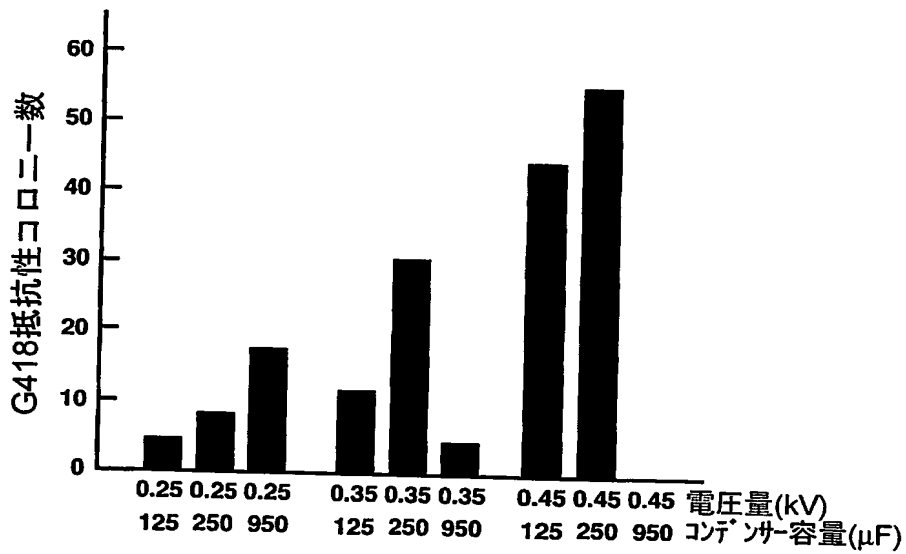
【図 4】



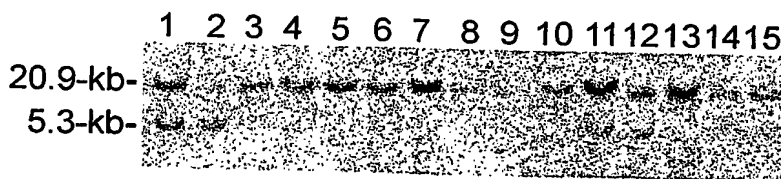
【図 5】



【図 6】



【図 7】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 本発明は、上皮細胞株に対する効率的な遺伝子ターゲッティング方法を提供することにある。

【解決手段】 マウスZ0-1遺伝子等の遺伝子座に対する高効率ターゲッティングベクターを開発した。そして、該ターゲッティングベクターを用いて上皮細胞に対するエレクトロポレーションの至適条件の検討を行った結果、上皮細胞株であるマウスEph4に対して効率的な遺伝子ターゲッティングが可能なエレクトロポレーションの至適条件の決定に成功した。

【選択図】 なし

特願 2 0 0 3 - 0 7 6 8 7 7

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[ 0 0 0 0 0 0 2 1 7 ]

1. 変更年月日

1 9 9 0 年 8 月 2 9 日

[変更理由]

新規登録

住 所

東京都文京区小石川 4 丁目 6 番 1 0 号

氏 名

エーザイ株式会社